

ANNÉE 1937

THÈSE

N° 233

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

ANGÉLI JEAN-CHARLES

Né le 4 Août 1906

à *Lusio (Corse)*

Des Vaccins anti-amarils
obtenus par culture de tissus vivants
Embryon de souris hacké - Embryon de poulet

Président : M. TANON, Professeur.

LIBRAIRIE MALOINE
27, Rue de l'Ecole de Médecine
PARIS-1937

22

ANNÉE 1937

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

ANGÉLI JEAN-CHARLES

Né le 4 Août 1906

à Giustin (Corse)

Des Vaccins anti-amarils

obtenus par culture de tissus vivants

Embryon de souris haché - Embryon de poulet

Président : M. TANON, Professeur.

LIBRAIRIE MALOINE

27, Rue de l'Ecole de Médecine

PARIS-1937

Le Doyen M. ROUSSY.

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	Robert DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale ..	BRUMPT.
Pathologie médicale et générale	BAUDOUIN.
Pathologie médicale	ABRAMI.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	LAIGNEL-LAVASTINE
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	Maurice VILLARET.
Clinique médicale	LÉPER.
	CARNOT.
	CLERC.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance ..	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants	NOBECOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	H. CLAUDE.
Clinique des maladies du système nerveux ..	GOUGEROT.
Clinique des maladies infectieuses	GUILLAIN.
	LEMIERRE.
	CUNEO.
Clinique chirurgicale	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	MARION.
	BRINDEAU.
Clinique d'accouchements	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique	MOCQUOT.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie ..	OMBREDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAI
Clinique propédeutique	SERGENT.
Clinique de la Tuberculose	BEZANÇON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte.	MATHIEU.
Cardiologie clinique	LAUBRY.
	HOVELACQUE.
Professeurs sans chaire	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.



II. — AGREGÉS EN EXERCICE

	MM.
Pathologie chirurgicale	AMELINE.
Pathologie médicale	BARIÉTY.
Pathologie médicale	BÉNARD Henri.
Pathologie médicale	BERNARD Etienne.
Hydrologie	BESANÇON Justin.
Pathologie médicale	BOULIN.
Histologie	BULLIARD.
Pathologie médicale	CATHALA.
Pathologie médicale	CHEVALLIER.
Pathologie médicale	COSTE.
Physique	DOGNON.
Urologie	FÉY.
Pathologie chirurgicale	FUNCK.
Parasitologie	GALLIARD.
Bactériologie	GASTINEL
Pathologie chirurgicale	DE GAUDART D'ALLAINES
Pathologie médicale	DE GENNES.
Physiologie	GAYET.
Histologie	GIROUD.
Pathologie médicale	HAGUENAU.
Oto-rhino-laryngologie	HALPHEN.
Pharmacologie	HAZARD.
Anatomie Pathologique	HUGUENIN.
Hygiène	JOANNON.
Chimie biologique	LABBE (Henri).
Obstétrique	LACOMME.
Obstétrique	LANTUEJOUL.
Pathologie médicale	LAROCHE Guy.
Pathologie médicale	LELONG.
Pathologie expérimentale	LEMAIRE.
Pathologie chirurgicale	LEVEUF.
Pharmacologie	Melle J. LEVY.
Neurologie et psychiatrie	LEVY-VALENSI.
Pathologie chirurgicale	MENEGAUX.
Pathologie médicale	MOLLARET.
Pathologie médicale	MOREAU.
Pathologie chirurgicale	MOULONGUET.
Pathologie médicale	MOUQUIN.
Anatomie pathologique	OVERLING.
Pathologie chirurgicale	PETIT-DUTAILLIS.
Médecine légale	PIÉDELIEVRE.
Obstétrique	PORTES.
Ophthalmologie	RENARD.
Physiologie	RICHET
Chimie biologique	SANNIÉ.
Pathologie chirurgicale	SÉNÈQUE.
Pathologie expérimentale	TROISIÈRE.
Pathologie médicale	TURPIN.
Obstétrique	VIGNES.
Pathologie chirurgicale	WILMOTH.

III. — AGREGÉS RAPPELES A L'EXERCICE POUR LE SERVICE DES EXAMENS

	MM.
Pathologie chirurgicale	ALGLAVE.
Pharmacologie	BUSQUET.
Physiologie	CHAILLEY-BERT.
Anatomie pathologique	LEROUX.
Parasitologie	NEVEU-LEMAIRE.
Bactériologie	PHILIBERT.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM		MM.	
ALAJOUANINE	Clinique médicale	BASSET	Clinique chirurgicale
AUBERTIN. ..		BROCQ	
BRULÉ.		CADENAT	
CHABROL ...		GATELLIER ..	
CHIRAY		HEITZ-BOYER	
DONZELOT ..		MOURE	
DUVOIR		QUENU	
LIAN		SCHWARTZ ..	
PASTEUR-VAL-		VELTER	
LERY-RADOT			
SÉZARY			

MM. ECALLE	Clinique obstétricale
GUÉNIOT	
LE LORIER	
LÉVY-SOLAL	
METZGER	

V. — CHARGÉS DE COURS

	MM.
Éducation physique	CHAILLEY-BERT, agrégé.
Radiologie clinique	LEDOUX-LEBARD.
Microbiologie	PHILIBERT, agrégé.
Stomatologie	RUPPE.
Puériculture	WEILL-HALLÉ.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MON FRÈRE PIERRE

A MA MÈRE

A MA FEMME

A MA FILLE

A MES SŒURS

A MES FRÈRES

MEIS ET AMICIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR TANON

Professeur d'Hygiène et de Médecine Préventive
à la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine

*Qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.
Qu'il trouve ici l'expression de nos sentiments respectueux et reconnaissants.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR NAVARRE

*Qui nous a inspiré le sujet de cette thèse et
dont les conseils nous furent si précieux.
Nous le prions d'accepter ici l'hommage de
notre gratitude.*

A MONSIEUR ANDRÉ VILLEJAN

De l'Office International d'Hygiène Publique

*Qui nous a guidé dans notre travail par ses
bienveillants conseils.*

*En témoignage de notre profonde reconnais-
sance.*

Historique

Depuis plus d'un demi-siècle, des recherches ont été entreprises par différents auteurs en vue de découvrir le germe du typhus amaril et des moyens de le combattre. Rappelons que Beauparthay admit sa transmission par le moustique, le premier, et que Finley démontra par des expériences nombreuses le rôle de l'*Aedes*.

Cette période peut schématiquement être divisée en trois étapes :

1° THÉORIE DE L'ULTRA-VIRUS

C'est Pasteur, en 1882, qui eut le premier l'idée que la fièvre jaune était due à un virus filtrant. Il se proposa de l'isoler et de le modifier pour en faire un vaccin ; mais c'est à Reed, Carrol, Agramonte et Lazéar en 1899 que revient le mérite d'avoir réussi à transmettre pour la première fois cette maladie à l'homme, en lui inoculant du sang filtré de jaunes. La théorie de l'ultra virus était de ce fait brillamment confirmée.

La commission Brésilienne (Ribas, Lutz, Barreto, Baras et Rodriguez) et la Commission de l'Institut Pasteur (Marchoux, Salimbeni et Simond) se rangèrent du même avis. Ces derniers apportèrent cette précision que le virus amaril traverse sans dilution la bougie Chamberland F mais est arrêtée par le filtre B.

2° THÉORIE SPIROCHÉTIENNE

Cette théorie de l'ultra virus paraissait définitivement acquise lorsqu'en 1918, on souleva la question de la nature spirochétienne de la fièvre jaune; Noguchi en fut le principal défenseur. Bien avant cette date, différents auteurs ont cru découvrir des germes qu'ils croyaient responsables du typhus amaril :

Domingo Foire (*Cryptococcus xanthogenicus*).

Carmone Y. Valle (*Peronospora lutéa*).

Lacerda, 1888 (*Cogumella*).

Findlay, Delgrado, Le Dantec, 1889.

Havelburg, 1897.

Samarelli, 1897, qui décrivit le *Bacillus icteroides* et tenta une sérothérapie spécifique.

Schaudinn, Novi et Stimson, 1907, trouvèrent dans le rein des jaunes un spirochète spécial qu'ils nommèrent « *interrogans*. »

Seidelin, 1912 (*Piroplasma bigeminum*).

Comme le montrera Schuffner en 1928, le « *leptospira icteroides* » de Noguchi, n'était autre que le *spirochète-ictéro-hémorragie*, agent de la spirochètose ictéro-hémorragique.

L'erreur de Noguchi entraîna des chercheurs tels que Perez Gravas, 1920, Leblanc, 1921, Lebledo, Perin, Muller, Froes, Vianna Biao, sur une fausse piste et retarda ainsi de dix ans l'étude de la fièvre jaune. Kuczinski décrivit encore en 1929 le *B. dystrophicans* comme agent de la fièvre jaune.

3° CONFIRMATION DE LA THÉORIE DE L'ULTRA VIRUS

Pendant 45 ans toutes les tentatives pratiquées par un

nombre considérable de bactériologistes pour isoler le germe du typhus amaril, n'avaient conduit qu'à des échecs.

Le 26 Mai 1927, à Accra (*Gold Coast*), la mission Rockefeller, composée de Stokes, Bauer et Hudson réussit à prouver que c'était bien à un virus filtrant qu'était dûe la fièvre jaune et que l'animal le plus sensible était le *Macacus rhésus*. C'est surtout à Adrien Stokes que revient le mérite de cette grande découverte, au cours de l'épidémie africaine de 1927, qui frappa cruellement les hommes de laboratoire : René Guillet, Noguchi et son assistant Jung, ainsi que Stokes lui-même. Quelques semaines plus tard, W. Sellards réussit à transmettre la fièvre jaune à certaines espèces de singes suivant la méthode pratiquée par Stokes. Il isola le virus et le confia à divers laboratoires de France, d'Angleterre et d'Amérique, où l'on se mit à la recherche du vaccin. On essaya de transformer le virus en vaccin en le tuant par la chaleur ou les antiseptiques.

Hindle en 1928, vaccina des singes avec un vaccin formolé et un vaccin phéniqué et obtint d'excellents résultats : sur 17 animaux traités par le vaccin formolé, 14 furent immunisés, et sur 4 animaux traités par le vaccin phéniqué, 3 résistèrent à une injection virulente.

Quelques jours plus tard, A. Pettit, G. Stéphanopoulo firent une communication à ce sujet. Ils employèrent un virus atténué et un anavirus ; ce dernier étant obtenu par le procédé de G. Ramon pour l'anatoxine. Le vaccin atténué fut vite abandonné car il était difficile de calculer son degré d'atténuation ; quant à l'anavirus, il donna de bons résultats : 8 *macacus rhésus* inoculés résistèrent à une injection de plusieurs grammes de foie virulent. Ces mêmes auteurs, en 1929, prouvèrent que le singe peut être vacciné avec un mélange de virus et de serum

de singe ou de cheval immunisé, et même avec du sang virulent desséché.

Au cours de la même année, H. de Beaurepaire Aragao prépara un vaccin formolé phéniqué qu'il essaya chez l'homme après avoir obtenu d'excellents résultats chez les animaux et réussit à vacciner 25.000 émigrants (24 seulement contractèrent la fièvre jaune). Cet auteur adopta ensuite une méthode de séro-vaccination et injecta 1 à 2 cc d'immun sérum de singe ou d'homme, puis 0 cc 3 de sang virulent ou une dilution correspondante de sang desséché, 24 heures après la première inoculation.

Lemos Monteiro et Davis, en 1929, préparèrent un vaccin chloroformé au 1/100, et Kuczinski un vaccin phéniqué. Toutes ces méthodes furent abandonnées car elles nécessitaient de nombreux singes et étaient, de ce fait, très coûteuses ; de plus, les tissus virulents étaient dangereux à manier.

DECOUVERTE DE LA RECEPTIVITE INTRA CEREBRALE DE LA SOURIS PAR THEILER.

C'est alors qu'en 1930, Max Theiler essaya de réaliser une économie en cherchant à transmettre la fièvre jaune à d'autres animaux que les singes. Il expérimenta sur des souris blanches en leur introduisant directement le virus dans le cerveau. Il réussit ainsi à leur communiquer une encéphalite, avec paralysie suivie de mort, alors qu'elles s'étaient montrées résistantes à une inoculation sous-cutanée ou intra-péritonéale. Cette encéphalite n'avait aucune ressemblance avec celle de la fièvre jaune ; aussi Theiler croyait s'être trompé et il reprit ses expériences avec Sellards. Ils firent cette constatation capitale que lorsqu'on injecte à des singes du cerveau

de l'une de ces souris paralysées, ces singes ne contractent pas la fièvre jaune, ils sont vaccinés contre elle. Ainsi a été créé à côté du virus du singe dit « viscerotrope », un virus de souris dit « neurotrope ».

C'est de cette découverte que sont nées les vaccinations avec le virus neurotrope de souris additionné d'immun sérum et les vaccinations avec le virus de souris seul.

LES SERO VACCINATIONS

En 1931, les membres du *Yellow Fever Laboratory de la Rockefeller Fondation*, Sawyer, Kitchen et Lloyd inoculèrent à l'homme le virus de la souris selon la méthode de la sérovaccination avec de l'immun sérum de sujets guéris de fièvre jaune et du vaccin cultivé sur cerveau de souris .

Le même procédé fut appliqué au Brésil par H. de Beurepaire Aragao et à Lagos (Nigeria), par l'*International Health Division*, et enfin par G.M. Findlay à Londres en 1932. D'excellents résultats furent obtenus, mais ce procédé demandait de grandes quantités de serum de jaunes guéris. Petit et Séphanopoulo montrèrent alors que le serum de cheval peut remplacer le serum humain en quantité cinq fois moindre et créèrent un centre de vaccination à l'Institut Pasteur. Leur procédé consistait à injecter par la voie intra musculaire, 0 cc 2 de serum de cheval immunisé par kilogramme de poids, et 4 heures après, une nouvelle injection sous-cutanée de 0 cc 5 de virus desséché, conservé à — 14° et redissous dans 0 cc 5 d'eau distillée, était pratiquée.

LA VACCINATION AVEC LE VIRUS DE SOURIS.

Le deuxième procédé fut appliqué par Sellards en 1931. Cet auteur employa le virus amaril seul, provenant du maca-

que et ayant passé 134 fois par le cerveau de la souris. Cette nouvelle méthode de vaccination donna des résultats assez encourageants, mais provoqua fréquemment des réactions importantes avec température élevée, vomissements et troubles nerveux.

Laigret modifia ce procédé en pratiquant à 20 jours d'intervalle trois injections de virus, de virulence croissante, soumis à des manipulations voisines de celles que l'on fait subir au virus fixe de Pasteur avant d'être employé pour la cure antirabique. Laigret et ses collaborateurs vaccinèrent ainsi plus de 2.000 personnes, mais 240 seulement reçurent les trois inoculations. Deux réactions importantes furent constatées : une chez un ancien lithiasique, lequel présenta de la céphalée, de la parésie des membres inférieurs, et de la raideur de la nuque dix jours après la deuxième injection ; l'autre survint le seizième jour après la première inoculation, avec céphalée, vomissements et raideur de la colonne vertébrale. Guérison sans sequelles des deux malades, en 15 jours. Sur les 10.000 personnes vaccinées par le procédé de Laigret, en 1934, aucune ne contracta la fièvre jaune. A Zinder, on enraya une épidémie en vaccinant tous les sujets. La population de la Gambie française, vaccinée, ne contracta pas la fièvre jaune, alors qu'une épidémie régnait en Gambie anglaise.

A la Côte d'Ivoire, la maladie a continué à se montrer sous formes « d'atteintes isolées, uniquement chez des sujets non vaccinés ».

Les trafiquants syriens n'ont pas fourni un seul cas de fièvre jaune depuis qu'ils ont été soumis à la vaccination. Ce dernier argument aurait incontestablement une grande portée si tous les syriens avaient été vaccinés ; mais il n'en est pas

ainsi et sa force diminue, puisque la fièvre jaune a épargné les uns et les autres.

Charles Nicolle et Laigret modifièrent le procédé en retardant l'absorption du vaccin. Pour celà, le virus atténué et desséché fut employé en suspension dans l'huile d'olive et dans le jaune d'œuf. Dans 21 cas, le virus fut enrobé dans le jaune d'œuf, dans 22 cas, dans l'huile d'olive et 48 fois dans un mélange huile jaune d'œuf. Aucun accident ne fut constaté.

Cette méthode de vaccination avait l'avantage de réduire de trois à une le nombre des injections, et préservait également des réactions locales et générales que l'on rencontrait dans la technique de la séro vaccination.

Diverses objections ont été soulevées contre les deux méthodes de vaccination, nées de la découverte de Theiler ; elles furent justifiées par de nombreuses expériences :

En Amérique, on avait démontré que des germes occasionnels : bactéries, protozoaires, virus filtrants, existent naturellement dans le cerveau de la souris et il faudrait essayer d'exclure ces germes si on veut éviter des symptômes encéphaliques :

a) contrôler et ensemercer en milieux aérobies et anaérobies les cerveaux de souris, avant et après la filtration sur filtre Seitz ;

b) essayer de dépister chez les souris des lésions pathologiques par des examens répétés.

En outre, il ne faudrait plus employer de virus après le 150^e passage sur le cerveau de souris, à cause de l'augmentation de son neurotropisme.

Si la technique de Nicolle-Laigret empêchait les différentes réactions nerveuses plus ou moins graves que l'on avait constatées dans les expériences antérieures, il a été prouvé

qu'elle n'empêchait pas la persistance du virus dans le sang circulant, d'où danger pour les sujets vaccinés et pour la collectivité dans laquelle ils vivent, par passage dans l'organisme du *Stegomya*, vecteur du virus amaril.

Ce genre de vaccination ne pourrait se pratiquer dans les pays où existe le *stegomya*, ou alors il faudrait isoler tout individu vacciné, jusqu'à l'apparition des anticorps dans son sang circulant. Findlay et Clark firent des expériences démontrant que les qualités d'une souche de virus sont différentes suivant le milieu environnant.

Findlay et Stern ont inoculé par voie nasale du virus viscérotrope chez deux animaux différents; le *Macacus Rhésus* a contracté la fièvre jaune, alors que la souris a présenté une encéphalo myélite. Ces auteurs ont montré également que si on a soin d'injecter sous la peau du macacus Rhésus, de l'immun serum amaril avant de lui inoculer le virus viscérotrope, l'animal présentera des signes d'encéphalite, alors que si l'immun sérum est injecté après l'inoculation du virus, l'animal contractera la fièvre jaune typique.

D'après ces expériences, il n'existerait qu'une seule forme de virus amaril, lequel renfermerait des particules neurotropes et viscérotropes. L'évolution se ferait suivant le type nerveux ou le type viscérotrope, selon les milieux dans lesquels il vit. On donna à ce virus naturel le nom de « pantrope ».

Les travaux de Penna, Findlay et Stern apportèrent la preuve que le virus pantrope peut, chez un grand nombre d'animaux réceptifs (hommes, singes, hérissons), atteindre aussi bien les tissus dérivés de l'ectoderme (cerveau), que ceux dérivés du mesoderme (rein, myocarde, rate, ganglions lymphatiques) et que ceux dérivés de l'entoderme (foie).

Theiler a observé que chaque fois que le virus amaril était inoculé par tout autre voie que la voie nerveuse, il provoquait : soit une encéphalite amarile, soit une infection bénigne, soit la fièvre jaune typique.

Findlay et Clark montrèrent qu'après plusieurs passages répétés à travers le foie de singe infecté par le virus neurotrope, on arrivait à un virus pantrope.

Depuis Novembre 1932, date à laquelle on a commencé à vacciner à Londres contre la fièvre jaune, jusqu'en 1935, il a été vacciné dans cette ville, par inoculation de virus et d'immun sérum un total de 951 Européens, se rendant dans les colonies britanniques.

En Afrique Equatoriale française, on a vacciné pendant la même période, 127 Européens, selon la méthode de l'Institut Pasteur de Paris.

En Afrique Occidentale française, 5699 sujets avaient reçu les trois injections du procédé Laigret, en Décembre 1935.

A cette époque, Lloyd, Theiler, Ricci modifièrent la méthode de la séro vaccination, afin de réduire le danger de transmission de l'encéphalite amaril aux personnes vaccinées. Ces auteurs substituèrent au cerveau de souris une culture embryonnaire hachée, ayant perdu progressivement son pouvoir pathogène viscérotrope, après de nombreux passages sur le même milieu pendant plusieurs mois.

Ce fut le début de l'application d'une nouvelle méthode de vaccination par culture du virus amaril sur tissus vivants. Nous en faisons le sujet de notre thèse, en nous proposant d'en décrire les avantages, qui diffèrent suivant les tissus employés comme milieu de culture.

VACCINATION AVEC LES CULTURES DE TISSUS

Il serait inutile et exagéré de notre part, — ce n'est d'ailleurs pas le but de notre travail, — de vouloir exposer tous les avantages qui militent en faveur de la vaccination avec des cultures de virus sur tissus vivants en général. Il faudrait pour cela évoquer toute l'histoire de la vaccinothérapie depuis ses débuts jusqu'à nos jours. Nous nous permettrons cependant de souligner un fait qui semble placer ce nouveau genre de vaccination au-dessus de tous les autres : c'est que même le procédé classique de Jenner pour la lymphé vaccinale a été à peu près abandonnée en faveur de cette méthode.

Parmi les milieux de culture employés, deux seulement doivent retenir particulièrement notre attention :

- a) l'embryon de souris haché,
- b) l'embryon de poulet.

CULTURES SUR EMBRYON DE SOURIS HACHÉ.

W. Lloyd, Max Theiler et N. I. Ricci furent les premiers à appliquer cette méthode au virus amaril, en 1935. Ils employèrent un procédé de culture qui est sensiblement le même que celui de Rivers et Ward pour la lymphé vaccinale.

Les embryons de souris étaient extraits aseptiquement des utérus de souris gravides et lavés pendant quatre heures dans une solution de *NaCl* à 0,9 %; ces embryons étaient ensuite coupés en petits carrés de 2 m/m de côté et placés dans une solution de Tyrode préparée selon la formule suivante :

<i>NaCl</i>	8 Gr.	
<i>KCl</i>	0 Gr.	2
<i>CaCl</i> ²	0 Gr.	2
<i>MgCl</i> ²	0 Gr.	1

Po ⁴ Na H ²	0 Gr. 05
Co ³ Na H	1 Gr.
Glucose	1 Gr.
Eau distillée q.s.p.	1 litre

dans les proportions de 0 Gr. 1 de tissus pour 5 c/c de solution.

A ce milieu de culture était ajouté 10 % en volume de sérum normal d'homme ou de *macacus rhésus*. Le virus (sérum de singe infecté ou suspension de cerveau de souris infectée) était ensemencé dans les tissus embryonnaires; l'ensemble placé dans des flacons d'Erlenmeyer hermétiquement bouchés et mis à l'étuve à 37° C. Les flacons avaient été numérotés de façon à ce que chaque subculture puisse être faite de flacon à flacon de numéro correspondant. Toutes ces cultures étaient incubées pendant trois à quatre jours avant le transfert dans un nouveau flacon. On vérifiait de temps en temps l'aseptie du milieu de culture soit par une simple inspection minutieuse (apparition d'un trouble en cas de présence de bactéries) soit en inoculant 0 cc 1 du milieu dans un tube à pneumocoques en cas de doute. On se rendait compte également à la fin de chaque subculture si le virus était toujours présent, en inoculant à des lots de souris, par la voie intra cérébrale, quelques centimètres cubes du milieu de culture.

Lloyd, Theiler et Ricci, cultivèrent ainsi plusieurs souches de virus amariil viscerotrope ou plus exactement pantrope sur plusieurs milieux en suspension dans une solution de sérum et liquide de Tyrode en flacons d'Erlenmeyer. Ils ont réussi plus de 130 subcultures avec le tissu embryonnaire de souris haché ou de poulet et de testicules de souris adultes; plus de 54 pasasges de la même souche avec du tissu ha-

ché de cobaye adulte et plus de vingt passages dans le même liquide et derme d'embryon de poulet.

Les souches cultivées par ces auteurs furent :

1° *la souche Asibi pantrope* ayant subi, en 6 ans $\frac{1}{2}$ 53 passages de singe à singe, avec des périodes intermédiaires de vie chez l'*Aedes Ægypti*.

Cette souche avait conservé son pouvoir pathogène et était capable de tuer 95 % des singes trois à sept jours après l'inoculation.

2° *la souche neurotrope française de Dakar* ayant subi 305 passages par cerveau de souris.

3° *la même souche*, mais utilisée après 105 passages seulement.

Ils inoculèrent un certain nombre de singes après plusieurs subcultures successives de ces différentes souches sur embryon de souris haché : Après les dix premiers passages, les deux singes inoculés moururent de fièvre jaune. Ils inoculèrent ensuite dix singes avec un virus du 15° au 25° passage. Cinq de ces animaux résistèrent à l'inoculation. Entre les 25° et 45° passages, il n'y eut qu'un seul singe mort sur neuf inoculés. Et enfin, du 45° au 105° passages, aucun des 17 animaux inoculés ne succomba.

Ces auteurs conclurent que le pouvoir viscérotrope du virus décroissait progressivement, sans modification du neurotropisme pendant 130 subcultures.

Il est à noter également que le temps d'incubation était toujours le même, ainsi que l'intervalle séparant le moment de l'inoculation de la mort de l'animal.

Si ces auteurs n'ont jamais rencontré de cas d'encéphalite lorsque l'inoculation était pratiquée en dehors de la voie nerveuse, ils ont cependant constaté que sur les 8 singes ino-

culés par le canal rachidien avec la souche Asibi, un animal seulement présenta une encéphalite, alors qu'avec la souche neurotrope française les 23 singes inoculés par la voie rachidienne contractèrent tous une encéphalite.

De nombreuses expériences ont confirmé le fait que, si une lente augmentation de virulence se rencontre entre les 20^e et 28^e passages, il s'agit toujours d'une accentuation des caractères viscérotropes, lesquels vont ensuite en diminuant, et après 130 passages, on se trouve en présence d'un virus à virulence viscérotrope diminuée, sans modification du neurotropisme.

La vaccination avec ce virus pantrope atténué, associé à l'immun sérum humain, a été alors tentée et on a réussi à immuniser fortement les singes inoculés par ce procédé.

Il a été prouvé que chaque fois qu'on associait au virus l'immun sérum humain à la dose de 0 cc 5 par kilogramme de poids d'animal, on pouvait toujours constater la présence d'anticorps dans le sang circulant depuis le moment de l'inoculation jusqu'à l'immunisation totale.

Les expériences de Lloyd, Theiler et Ricci ayant été satisfaisantes chez l'animal, Lloyd tenta alors la vaccination chez l'homme.

Il inocula 20 personnes avec une quantité connue d'immun sérum humain, titré suivant la méthode de Sawyer, Kitchen et Lloyd. Il employa des quantités de virus variant entre 25.000 et 170.000 doses minima mortelles pour la souris et des quantités d'immun sérum humain, variant entre 0 cc 5 et 0 cc 6 par kilogramme de poids du corps.

Sur les 20 personnes ainsi vaccinées, 7 seulement présentèrent une légère élévation de température, sans toutefois dépasser 37°7 c. Un sujet présenta de la céphalée, avec sen-

sation de froid et de malaise le 3^e jour après l'inoculation. Aucun symptôme de maladie ne fut observé chez les autres personnes pendant la période de surveillance. Deux observations détaillées seulement ont pu être prises : De la leucopénie assez marquée a été constatée chez les deux personnes : les 5^e, 6^e et 7^e jour chez l'une ; le 6^e jour chez l'autre. (4.000 leucocytes par m/m³). Ni l'une ni l'autre ne présentèrent d'albuminurie à aucun moment.

Chez 13 sujets vaccinés, durant la période de 14 à 28 jours qui suivit l'inoculation, on pratiqua la recherche des anticorps protecteurs. On en trouva chez tous, le titre variant entre 1/8 et 1/128 ; chez aucun d'entre eux on ne décéla aucune trace de virus amaril dans leur sang circulant.

Les légères augmentations de température constatées chez 7 sujets parmi les 20 vaccinés et le fait que cet état subfébril survint chaque fois deux à six jours après la vaccination, permet d'écarter toute idée d'encéphalite amarile, puisque dans cette dernière l'élévation de température s'observe beaucoup plus tard, vers le 7^e et même 14^e jour et qu'elle est d'une plus grande intensité et d'une plus grande durée.

Aucune des 190 personnes ainsi vaccinées à Londres au moyen du virus cultivé sur tissu vivant d'embryon de souris et d'immun sérum humain n'a eu de réaction suffisamment sérieuse pour l'obliger à s'aliter. En dehors d'une légère céphalée vers le 3^e ou 4^e jour, les malades ne se sont plaints d'aucun malaise, sauf dans un cas où, cinq jours après l'inoculation, un homme a présenté une amygdalite folliculaire bénigne banale.

En Amérique, ce nouveau genre de vaccination ne sembla guère convaincre les auteurs qui s'intéressaient à cette question. En effet ceux-ci montrèrent que si on prend des cultures

bactériologiquement stériles, faites avec des cerveaux de souris apparemment saines et si on injecte à d'autres souris par la voie intra cérébrale le liquide filtré à travers les bougies de Berkefeld, on voit que ce filtrat est pathogène, non seulement pour les nouvelles souris inoculées, mais encore pour les *Macacus Rhésus*, les rats et les cobayes en produisant des lésions au niveau des méninges et des plexus choroïdes. Les lésions seraient dues à un virus identique à celui de la chorioméningite lymphocytaire décrite par Armstrong et Lillie, en 1934. Ce virus pousse facilement en culture sur sérum-solution de Tyrode et embryon de souris haché, mais comme il est beaucoup plus gros que le virus de la fièvre jaune, on pourrait le séparer par filtration.

Il paraissait donc judicieux d'éviter l'emploi dans le milieu de culture de tissu d'embryon de souris, dans la crainte que le virus de la chorioméningite lymphocytaire ou quelque autre virus comme celui de la glande salivaire des souris, ne puisse être dans le milieu.

On s'orienta alors vers une autre voie, qu'était celle de la culture des virus sur embryon de poulet, déjà étudiée par Lloyd, Theiler et Ricci dans leurs expériences.

CULTURE SUR EMBRYON DE POULET.

La membrane chorio allantoïdienne de poulet en état de développement, avant de servir comme milieu de culture pour les virus filtrants, avait déjà été utilisée par Rouss et Murphy, en 1911, pour étudier les tumeurs des volailles.

Plus tard, en 1931, Goodpastures et Budding montrèrent que cette membrane était un très favorable milieu de culture pour les infections à virus filtrants et en particulier pour le virus vaccinal, lesquels virus pouvaient y être cultivés indéfiniment.

Pendant ces cinq dernières années, un grand nombre d'ouvrages de différentes provenances ont été publiés à ce sujet. Il résulte de ces études que cette membrane est extraordinairement prédisposée à recevoir une grande quantité de virus, lequel se développe avec facilité, aussi bien dans la membrane que dans l'embryon, bien qu'il ne soit pas capable d'infecter le poussin.

La culture sur embryon de poulet paraît d'autant plus intéressante qu'elle permet d'avoir moins souvent recours aux animaux de laboratoire et que de plus, un titrage exact en virus peut y être facilement fait.

Dans les cas où les virus produisent des lésions en foyer, ces lésions peuvent être comptées et on a ainsi une indication plus précise que celle donnée par les animaux de laboratoire habituellement utilisés.

Cette membrane offre également des conditions très favorables pour les études histologiques des lésions provoquées par les infections à virus. Sa structure normale est tellement simple que chaque réaction de l'infection peut être étudiée facilement et suivie dans ses moindres détails.

Les risques d'une infection accidentelle par les animaux d'expérience sont beaucoup plus réduits, car le virus est renfermé dans l'œuf inoculé avec autant de sécurité que les bactéries dans les tubes de culture. Une très intéressante possibilité ressort des passages successifs et prolongés des virus dans les œufs : c'est qu'ils changent avantageusement de caractère, demeurant virulents pour l'œuf membrane, ils perdent leur virulence pour les animaux d'expérience.

Si les caractéristiques des virus peuvent être perpétuées, la valeur d'une telle culture pour l'immunisation des hommes serait évidente. Toutefois une précaution est nécessaire : ce

virus ayant déjà changé une fois de caractère, c'est qu'il est « instable » et une reversion à la forme virulente originale peut se produire de façon inattendue.

Lloyd, Theiler et Ricci, en 1935, cultivèrent le virus amaril suivant une méthode sensiblement la même que celle employée par Carrel et Rivers en 1927, et que Goodpastures et Buiding en 1931 pour la lymphe vaccinale. Ils prirent des œufs fertiles après neuf à onze jours d'incubation ; la zone destinée à être ouverte était désinfectée, une ouverture était pratiquée aseptiquement dans la partie la plus sombre de l'œuf, on incisait la membrane coquillière et on déposait sur l'allantochorion une petite colonie de la même souche pantrope asibi, employée déjà pour la culture sur embryon de souris. L'ouverture était bouchée à la paraffine, on plaçait les œufs sur un support de manière à faire plonger le sac à air dans un bain chaud à 38° C. Après quatre jours d'incubation, les œufs étaient retirés de l'étuve ; on enlevait aseptiquement la coquille et la membrane coquillière ; l'allantochorion était incisé et vidé de son contenu. L'embryon était ensuite lavé pendant quatre heures dans une solution saline à 0,9 % et coupé en petits morceaux. La méthode de culture était alors la même que celle employée avec l'embryon de souris.

Ces auteurs ont ainsi réussi plus de 130 subcultures en solution de Tyrode en flacons d'Erlenmeyer.

En 1936, on tenta la vaccination suivant le procédé employé avec l'embryon de souris, en y apportant quelques modifications :

- L'embryon de poulet remplaçait l'embryon de souris ;
- Avant de convertir en vaccin la culture en présence des tissus, on faisait un seul passage par cerveau de souris, en ayant soin de prendre des souris d'une race élevée spécia-

lement et connue pour être exempte d'autres infections.

Les souris étaient tuées 7 jours après l'inoculation, quand les symptômes commençaient à apparaître ; l'émulsion de cerveau était filtrée sur un disque Seitz que le virus de la chorioméningite lymphocytaire ne traverse que difficilement. Par ce moyen, on conservait le titre en virus du vaccin et on diminuait beaucoup le danger d'inoculer à l'homme, un matériel non filtré pouvant contenir d'autres virus.

Après l'injection d'immun sérum humain et de virus pantrope ainsi cultivé, on ne trouva en aucun cas de virus libre dans le torrent sanguin circulant. A quelques exceptions près, les sérums ont été éprouvés trois ou quatre semaines après la vaccination au point de vue de l'immunité : des anticorps s'y étaient développés. Il est prouvé que le virus amaril cultivé suivant cette dernière méthode doit être toujours associé à de l'immun sérum, car lorsqu'il est employé seul, il n'est pas exempt de dangers.

Une seule difficulté restait donc à résoudre, c'était celle se rapportant à l'immun sérum.

EMPLOI DE L'HYPERIMMUN SERUM DE SINGE.

Bien que l'injection d'un sérum homologue ne donne lieu à aucune réaction sérique, l'emploi de l'immun sérum humain dans la vaccination anti amarile chez l'homme présente deux inconvénients :

L'un est que, même très peu de temps après la guérison d'une sévère atteinte de fièvre jaune, le titre protecteur du sérum n'est pas très élevé, et que par conséquent, pour que la vaccination protège suffisamment, il faut pour un sujet de taille moyenne, une quantité de sérum relativement importante.

Le second inconvénient est qu'en raison du peu d'immun sérum et du peu de bons donneurs dont on dispose, le nombre des vaccinations que l'on peut entreprendre est immédiatement limité.

Autrefois, le titre de la plupart des immun sérums humains employés pour la vaccination était tel que pour assurer une bonne protection contre le virus, il en fallait 0 cc 6 par kilogramme de poids du corps, soit environ 40 cc par sujet de taille moyenne.

En 1935 Withman avait publié 14 observations sur la réaction des lapins à l'injection de virus amaril. Il constatait que si l'on injectait à cet animal une petite dose initiale de virus amaril, le sérum de lapin acquérait un léger pouvoir protecteur contre le virus; mais si, après l'injection de la dose initiale, on laissait les animaux au repos pendant six semaines ou plus, et qu'alors on leur injectait une seconde dose très forte de virus, il y avait une rapide élévation du titre des anticorps qui atteignait un maximum au bout de deux semaines après la seconde injection, puis redescendait graduellement à nouveau jusqu'à un titre très faible. Si l'on saignait les animaux au moment où le titre des anticorps était le plus élevé, le sérum prélevé présentait des propriétés protectrices plus de vingt fois supérieures à celles du sérum humain utilisé pour la vaccination anti amarile.

Withman concluait qu'un titre aussi élevé n'était possible que chez les animaux non réceptifs, car on ne l'avait jamais observé auparavant, soit chez l'homme, soit chez le singe, même après guérison d'une très sévère atteinte de fièvre jaune.

Suivant la technique de Withman, Max Theiler et Smith ont vacciné contre la fièvre jaune des singes rhésus, soit par

injection simultanée de virus virulent et d'immun sérum, soit par injection de virus seul, de très faible virulence viscérotrope. Après un repos de six semaines ou plus, les animaux reçurent une autre injection de virus viscérotrope très virulent, la souche Asibi en général. Pour cette seconde inoculation, la source de virus était représentée en général, par le sang total ou le sérum prélevé au début de la fièvre jaune chez un singe infecté. Le titre infectieux d'un tel matériel est presque toujours de 10^{-7} ou 10^{-8} centimètres cubes. La quantité de sang ou de sérum infectant injecté variant de 1 à 6 cc par singe, suivant la quantité de matériel infectant dont on disposait.

Par un titrage quotidien du pouvoir protecteur du sérum de singe après la seconde inoculation, ils constatèrent que celui-ci atteignait un maximum entre les septième et onzième jours, puis qu'il déclinait rapidement jusqu'à son faible titre initial. En conséquence, les singes étaient saignés habituellement le neuvième jour après la seconde inoculation et les sérums de dix animaux ou plus étaient mélangés. Ces mélanges ont constamment présenté un titre protecteur au moins vingt fois supérieur à celui de l'immun sérum employé dans la vaccination humaine. Occasionnellement, chez certains singes, l'activité protectrice du sérum a été de 60 à 80 fois supérieure à celle de l'immun sérum humain moyen. Les auteurs ajoutèrent du merthiolate, de manière à obtenir une concentration finale de 1 pour 10.000. Le sérum était ensuite filtré sur filtre Seitz. Des cultures aérobies et anaérobies furent faites pour éprouver la stérilité, et le titre protecteur final était déterminé par le test de protection de la souris et comparé à celui de l'immun sérum humain standard utilisé pour la vaccination.

Ce sérum hyperimmun de singe a été employé avec de bons résultats pour la vaccination d'un nombre considérable de personnes. Comme il est hétérologue, il est probable que l'homme l'élimine plus rapidement que l'immun sérum humain, aussi donne-t-on en général, dans la vaccination, le double d'unités protectrices théoriquement nécessaires. (La quantité utile pour une personne de taille moyenne serait de 4 cc environ, dose qui peut être facilement injectée sous la peau du bras).

En plus de la commodité de l'injection de petit volume, l'emploi de sérum de singe a l'avantage qu'il peut être préparé en grandes quantités sans difficultés et qu'il ouvre la possibilité de vacciner activement plus de gens qu'on ne pouvait le faire jusqu'ici avec l'immun sérum humain.

Au cours des dix derniers mois de 1936, un grand nombre de sujets ont été vaccinés par Max Theiler et Smith au Laboratoire de la Division d'Hygiène Internationale de la fondation Rockefeller à New-York, au moyen de ce sérum hyperimmun de singe et d'un virus amaril cultivé sur embryon de poulet. Les résultats ont été bons au point de vue des réactions sériques qui furent presque toujours insignifiantes et du degré d'immunité obtenu qui fut satisfaisant. Cependant, une personne, parmi les sujets vaccinés, présenta une forte réaction sérique post-vaccinale, caractérisée par un erythème généralisé et un urticaire avec température élevée suivi de polyarthrite. Cet état persista six jours, puis se calma rapidement après l'administration d'adrénaline. (une légère douleur dans les genoux persista longtemps). Dans l'ensemble, une réaction aussi sévère paraît rare. Ces auteurs l'observèrent une seule fois dans une série de 35 personnes vaccinées.

Environ 500 personnes ont été vaccinées au Brésil avec

du sérum de singe hyperimmun et du virus obtenu par culture sur tissu embryonnaire de poulet; aucune réaction sérique grave n'a été constatée.

En fait, dans un groupe de 125 personnes vaccinées au Brésil par cette méthode, 35 % n'ont présenté de réaction d'aucune sorte. Chez les 65 % restants, la réaction a été en général locale et s'est manifestée par un léger urticaire prurigineux au siège de l'inoculation, et qui a persisté de 24 à 48 heures.

Dans cette série, une personne seulement a dû interrompre son travail une demi-journée du fait de la réaction sérique.

Pendant les 9 premiers mois de 1936, il n'a été notifié à l'Office International d'Hygiène Public que :

- 16 cas de fièvre jaune en Bolivie,
- 180 cas dans les 7 Etats du Brésil;
- 51 cas en Colombie,
- 20 cas en Afrique Occidentale (13 pour les colonies françaises et 7 pour les colonies anglaises).

Il est prouvé actuellement que l'immunité produite par la vaccination dure moins longtemps que celle consécutive à une atteinte de fièvre jaune. Il semblerait donc prudent de vérifier deux ou trois ans après la vaccination l'état de l'immunité, et si celle-ci est affaiblie ou nulle, de refaire la vaccination.

Avons-nous le droit d'affirmer que la fièvre jaune est enfin vaincue ?

Nous ne nous permettrons de répondre qu'avec une certaine hésitation. Si les chiffres cités montrent que le typhus amaril est nettement en voie de régression, il faut avouer cependant, qu'en certains pays où la vaccination n'a pas été

pratiquée, les cas de fièvre jaune ont à peu près également disparu. Y a-t-il identité parfaite entre les différentes souches de virus étudiées dans les laboratoires et celles existant dans les contrées où la fièvre jaune sévit à l'état endémique ?.. L'avenir seul nous le prouvera.

Conclusions

- I. — Les théories concernant le typhus amaril ont été, successivement :
- 1°) *la théorie de l'ultra virus* ;
 - 2°) *la théorie spirochétienne* ;
 - 3°) *la théorie de l'ultra virus confirmée en 1927 par la mission Rockefeller*.
- II. — Découverte très intéressante de Theiler, en 1930 : *réceptivité intracérébrale de la souris blanche*, d'où naquirent les deux méthodes de vaccination :
- 1°) *Les séro-vaccinations* (vaccin additionné d'immum sérum humain), inapplicables, vu la grande quantité de sérum de jaunes guéris, nécessaire.
 - 2°) *Les vaccinations avec le virus de la souris seul*, appliquées par Sellards en 1931, modifiées d'abord par Laigret qui pratiquait 3 injections de virus de virulence croissante à 20 jours d'intervalle, puis par Nicolle et Laigret qui enrobèrent le virus dans le jaune d'œuf et l'huile d'olive, mais ne purent éviter la persistance du virus dans le sang circulant.
- III. — *Les cultures de tissus* ont donné lieu à une série d'études qu'on peut schématiquement résumer ainsi :
- 1°) *L'embryon de souris haché* a d'abord été cultivé pendant 130 subcultures dans une solution de Tyrode additionnée de sérum normal d'homme, dans des

flacons d'Erlenmeyer. Vaccination de 20 personnes par Lloyd. Bons résultats; quelques troubles nerveux et une légère augmentation de température ont été constatés.

- 2°) *L'embryon de poulet* a remplacé l'embryon de souris; on a fait un seul passage du virus par cerveau de souris d'une race élevée spécialement et connue pour être exempte d'autres infections à virus.
- 3°) Le sérum humain a été remplacé par de *l'hyperimmun sérum de singe*. Vaccination au Brésil en 1936 de 500 personnes, avec un vaccin obtenu par culture sur embryon de poulet additionné d'hyperimmun sérum de singe. Résultats très encourageants au point de vue des réactions sériques, et de l'immunité obtenue.

Vu, le Doyen :

ROUSSY.

Vu, le Président :

TANON.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

Bibliographie

- THEILER et SELLARS. — *Annales of tropical medicine and parasitologie*, 1928, Tome XXIV, page 449.
- THEILER. — *Annals of tropical medicine and parasitologie*, 1930, Tome XXIV page 249.
- THEILER et SMITH. — *Bul. Off. Int. d'Hyg. Pub.* 1936, Tome XXVIII, Fasc. 12.
- LLOYD, THEILER et RICCI. — *Trans. of the Royal Society of tropical med. and hyg.* 1936, Vol. XXIX, N° 5, page 481.
- *Bul. Off. Int. d'Hyg. Public*, 1935, page 2365.
- LLOYD, KITCHEN et SAWYER. — *The journal of experimental medicine*, 1932, Tome LV, page 945.
- LAIGRET. — *Bul. de la Société de pathologie exotique*, 1933, Tome XXVI, page 806.
- LAIGRET et SELLARDS. — *Compte rendu de l'Académie des Sciences*, 1932, Tome 194, page 1609.
- FINDLAY et HINDLE. — *British journal*, 1931, page 740.
- FINDLAY et CLARK. — *Trans. Royal Soc. trop. med. et Hyg.*, 1935, Vol. 28, page 579.
- FINDLAY. — *Bul. de l'Of. Int. d'Hyg. Pub.*, 1933, Tome 25, page 1009.
- *Bul. de l'Of. Int. d'Hyg. Pub.*, 1934, Tome 26, page 43.
- *Bul. de l'Ac. de Medecine*, 1935, Tome 113, page 78.

- FINDLAY et STERN. — *H. path. and Bact.*, 1935, Tome 41, page 431. — *Bulletin de l'Of. Int. d'Hyg. Pub.*, avril 1936, tome 28, page 736.
- FINDLAY, ALCOK and STERN. — *Lancet*, I-1936, page 650.
- NICOLLE et LAIGRET. — *Bul. de l'Of. Int. d'H. P.*, 1935, page 2012.
- KITCHEN. — *The American journal of tropical med.* 1931, Tome XI, page 365.
- PETTIT et STEPHANOPOULO. — *Presse médicale*, 1933, N° 50, page 1016.
- ARMSTRONG et LILLIE. — *Public Health Rep.*, 1934, Tome 50, page 831.
- BURNET. — *Medical research concil*, 1936, page 3.
- JAMES. — *Bul. de l'Of. Int. d'Hyg. Pub.*, 1936, Tome XXVIII, Fasc. 12.
- SOREL. — *Bul. de l'Of. Int. d'Hyg. Pub.*, 1936, Tome XXVIII, Fasc. 7.
- VILLEJEAN. — *Maladies pestilentiellles*, 1933.
- BROQUET. — *Bul. de l'Institut Pasteur*, 1936, N° 20, page 1020 .
- MOLLARET. — *Traitement de la fièvre jaune*, 1936.
-

